

DERWENT-ACC- 2000-065675**NO:****DERWENT-WEEK:** 200007*COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD***TITLE:** Oocytes container for measuring electrical change - has conical shape and electrode on central line**PATENT-ASSIGNEE:** HITACHI LTD[HITA]**PRIORITY-DATA:** 1998JP-0114619 (April 24, 1998)**PATENT-FAMILY:**

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 11299496 A	November 2, 1999	N/A	007	C12Q 001/02

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP 11299496A	N/A	1998JP-0114619	April 24, 1998

INT-CL (IPC): C12M001/00, C12Q001/02 , G01N033/483**ABSTRACTED-PUB-NO:** JP 11299496A**BASIC-ABSTRACT:**

NOVELTY - Oocytes container for measuring electrical change, is new. The position of oocyte (2) is fixed by using the container (1) having a conical shape and an electrode (3) on the center line. The electrode is inserted into the oocyte having ion channel or receptor protein which enables gene transfer. The electric change of oocyte is measured and expressed specifically.

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for measuring device for electrical change of oocytes.

USE - The container is useful for measuring electrical change of oocytes such as oocytes having ion channel or receptor protein or receptor which enables gene transfer, and so on.

ADVANTAGE - The electric physiology experiment of oocyte can be easily performed manually.

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows container for oocytes. (1) Container; (2) Oocyte; (3) Electrode.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.1/8**DERWENT-CLASS:** B04 D16 S03

EPI-CODES: S03-E14H;

(51) IntCl.⁶
 C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 M 1/00
 G 0 1 N 33/483

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 M 1/00
 G 0 1 N 33/483

A
 E

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平10-114619

(22) 出願日 平成10年(1998)4月24日

(71) 出願人 00005108

株式会社日立製作所
 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 福藤 真一

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
 社日立製作所基礎研究所内

(72) 発明者 大友 純

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
 社日立製作所基礎研究所内

(72) 発明者 竹下 智子

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
 社日立製作所基礎研究所内

(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

最終頁に続く

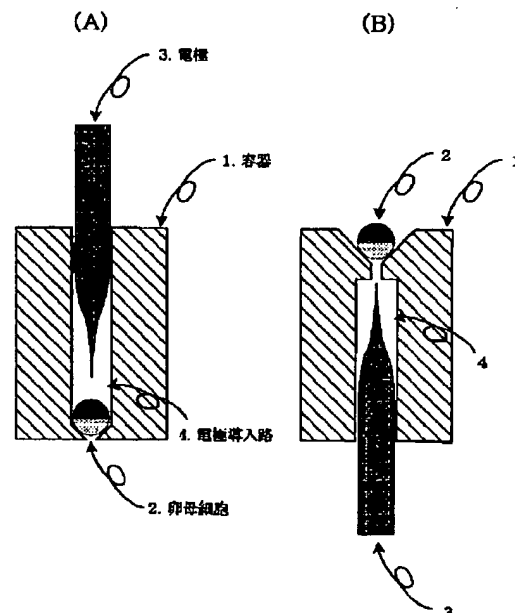
(54) 【発明の名称】 卵母細胞用容器およびそれを用いた計測装置

(57) 【要約】

【課題】顕微鏡、マイクロマニピュレーターや除振台などの大型装置を用いることなく、簡便かつ確実に卵母細胞への電極挿入を可能とし、卵母細胞の電気生理実験を容易にする。

【解決手段】錐形状の構造を有する容器を用いることで卵母細胞の位置を固定し、この容器の中心線上に電極を配置することにより、電極を卵母細胞内に挿入する。

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】イオンチャンネルまたは受容体の蛋白質を有する卵母細胞、特に遺伝子を導入して発現させた受容体を有する卵母細胞の電気的変化を測定するに際し、当該卵母細胞が位置する構造が錐形状の構造を有し、当該錐形状の構造の中心線上に位置する導電性電極を具備することを特徴とする卵母細胞用容器。

【請求項2】上記導電性電極を当該卵母細胞内に挿入する機構を具備することを特徴とする請求項1記載の卵母細胞用容器。

【請求項3】上記導電性電極を細胞内に挿入する手段、導電性電極と接地間の電位差の変化を検知する手段、挿入動作を停止させる手段を具備する請求項1または2記載の容器を用いたことを特徴とする卵母細胞用計測装置。

【請求項4】上記電極挿入動作を停止後、導電性電極と接地間の電位差が変化しない範囲内で導電性電極と細胞を引き離す手段を具備することを特徴とする請求項3記載の卵母細胞用計測装置。

【請求項5】上記導電性電極を細胞内に挿入するために、導電性電極または卵母細胞を振動させる手段を具備することを特徴とする請求項4記載の卵母細胞用計測装置。

【請求項6】請求項3ないし5のいずれか記載の卵母細胞用計測装置において、計測手段として膜電位固定が可能な手段を具備することを特徴とする卵母細胞用計測装置。

【請求項7】上記導電性電極が1本であることを特徴とする請求項3ないし6のいずれか記載の卵母細胞用計測装置。

【請求項8】上記導電性電極が電解質液の入ったガラス管であることを特徴とする請求項3ないし7のいずれか記載の卵母細胞用計測装置。

【請求項9】上記導電性電極が絶縁被覆した導電性線材であることを特徴とする請求項3ないし7のいずれか記載の容器と当該容器を具備する卵母細胞用計測装置。

【請求項10】上記導電性線材の主要成分が炭素であることを特徴とする請求項9記載の卵母細胞用計測装置。

【請求項11】上記受容体蛋白質が化学伝達物質の受容体であることを特徴とする請求項3ないし9のいずれか記載の卵母細胞用計測装置。

【請求項12】上記化学伝達物質がヒスタミン、セレトニン、ロイコトリエン、プロスタグランジンの少なくともいずれか一者であることを特徴とする請求項10記載の卵母細胞用計測装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はイオンチャンネルまたは受容体の蛋白質を有する卵母細胞、特に遺伝子を導入して発現させた受容体を有する卵母細胞が生じる電

気的变化を測定する卵母細胞用計測装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生体の情報伝達機構の解明を目的として、神経関連細胞を中心に細胞膜に存在する蛋白質の機能解析が行われ、その解析手段の一つとして電気生理学的測定方法が古くから用いられ、生体の情報伝達機構の解明に役立ってきた。また、生体の情報伝達機構を担っている受容体やイオンチャンネルなどの遺伝子が単離され、その発現クローニングや機能解析が行われてきた。近年、このような受容体やイオンチャンネルなどの発現や機能解析に卵母細胞が頻繁に利用されるようになった。

【0003】この卵母細胞を利用した受容体の発現の実験はGundersen らにより、セロトニン受容体で初めて行われた公知の方法 (Gundersen, C.B. et al., 1984, ネイチャー (Nature) 308, 421-424) であり、その概略を以下に記す。

【0004】未受精の卵母細胞に受容体の mRNA を注入し、培養液中で培養すると細胞膜に受容体が発現する。この受容体は卵母細胞膜中で活性があり、卵母細胞に内在する情報伝達系と共役する場合、リガンドが受容体に結合すると、卵母細胞内にすでに存在する細胞内情報伝達物質を介して情報が伝わり、細胞内カルシウム濃度が上昇し、このカルシウムが細胞膜上にあるクロライドイオンチャンネル (Cl⁻チャンネル) を開ける。その結果、卵母細胞内外の膜電位の変化が起こる。

【0005】このような卵母細胞発現系における細胞の生理変化を検出する方法として放射性トレーサの取り込みや流出を測定する方法、細胞内情報伝達関連物質の増減を検出する方法などがあるが、広く用いられてきたのは電気生理的測定方法である。

【0006】従来、卵母細胞の電気生理的測定方法としては、2本電極膜電位固定法が広く用いられている。本方法は何らかの手法で固定した卵母細胞に膜電位測定用微小ガラス電極と膜電位を固定するために通電する電流用微小ガラス電極の2本の電極を顕微鏡下でマイクロマニピュレーターにより卵母細胞に挿入しており、顕微鏡やマイクロマニピュレーターおよびこれらの振動を除去するための除振台など大型の装置構成であった。本従来法は実験室レベルにおいて、生体の情報伝達機構を担っている受容体やイオンチャンネルなどの遺伝子の発現クローニングや機能解析については、十分な方法であった。

【0007】しかし、本発明者らは卵母細胞発現系による受容体やイオンチャンネルなどの機能解析のみならず、これらのリガンドを定量測定することを対象として研究開発を行っている。例えば、アレルギー反応に関与するヒスタミンについて、ヒスタミン受容体遺伝子を導入した卵母細胞を用いて生体内のヒスタミン濃度を測定することによって、アレルギー疾患の判定が行えると考

えられる。このように生体の情報伝達機構を担っている受容体やイオンチャンネルなどの遺伝子を導入した卵母細胞をバイオセンサとして利用できる。しかし、従来の大型で煩雑な装置は研究室レベルでは必要に耐えうるが、簡便性や迅速性が求められる臨床レベルでは実用的ではない。

【0008】一方、卵母細胞には利用されていないが、細胞体の小さな神経細胞やパッチクランプでは1本電極膜電位固定法が広く用いられ、2本電極型装置と比較して装置構成が簡略な測定装置が提供されている。しかし、これらの神経細胞測定装置はpAレベルの電流量を対象にしており、nAレベルの電流量を発生する卵母細胞の場合、従来の1本電極膜電位固定装置をそのまま使用することは困難であった。また、顕微鏡やマイクロマニピュレーターおよびこれらの振動を除去するための除振台などを使用している点では2本電極法と同じであり、臨床レベルで用いることは困難であった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術はいずれも微小ガラス電極を卵母細胞に挿入するためにマイクロマニピュレーター、顕微鏡や除振台など大型で煩雑な装置構成になるという問題があった。

【0010】本発明の目的はイオンチャンネルまたは受容体の蛋白質を有する卵母細胞、特に遺伝子を導入して発現させた受容体を有する卵母細胞の電気生理的測定装置において、顕微鏡、マイクロマニピュレーターや除振台などの大型装置を用いることなく、簡便かつ確実に卵母細胞に電極を挿入可能な容器および上記容器を用いて卵母細胞の電気的変化量を1本または複数の電極を一体化した複合電極を用いて測定可能な卵母細胞用計測装置を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明の卵母細胞用計測装置は、図1に示すように錐形状の構造を有する容器を用いることで卵母細胞の位置を固定し、この容器の中心線上に電極を配置することにより、簡便かつ確実に電極を卵母細胞内に挿入する。また、図2に示すように電極保護容器を用いることで、導電性電極の先端を破損することなく、容易に電極を卵母細胞内に挿入する。

【0012】本発明によれば、顕微鏡、マイクロマニピュレーターや除振台などの大型装置を用いることなく、簡便かつ確実に卵母細胞に電極を挿入可能となり、卵母細胞の電気生理実験を肉眼下で手作業により容易に行うことができる。

【0013】

【発明の実施の形態】前記目的のひとつである、顕微鏡やマイクロマニピュレーターを用いることなく導電性電極を卵母細胞内に挿入可能な卵母細胞用容器として、錐形状の構造を有する容器を用いることで卵母細胞の位置を固定し、この容器の中心線上に導電性電極を配置する

ことにより、簡便かつ確実に当該電極を前記卵母細胞内に挿入可能な卵母細胞用容器の例を図1に示す。

【0014】図は断面を示しており、錐形状の構造とは例えば円錐や角錐を指すものである。本容器1は重力により錐形状の中心に卵母細胞が位置決めされることを利用しており、卵母細胞2に電極3を挿入する際には垂直にすることが望ましい。ただし、電極3挿入後は卵母細胞2が固定されるため、あらゆる方向に置くことができる。また、電極挿入路4と卵母細胞の間は水溶液で満たされるものとするが、水溶液の代わりにゲル状または多孔質状の物質を充填することも可能である。

【0015】図1には錐形状の構造を持つ卵母細胞用容器1と電極3が独立して構成される場合を示しているが、本容器1と電極3が一体で構成される（電極3が固定されている）場合は、卵母細胞1を機械的に電極3に押し付ける、卵母細胞2を電極3側に向かって吸引する、容器1または電極3を振動させることなどにより、電極先端を卵母細胞2に挿入する操作および装置が考えられる。特に、図1(B)の例では卵母細胞2を容器1に入れる前に、電極3を錐形の直下に固定することも可能であり、前述の方法で卵母細胞2への電極3の挿入が可能である。

【0016】次に、上記容器に容器とは独立した導電性電極3を装着するに際して、電極3先端の破損を防止するために電極導入補助構造を具備する卵母細胞用容器の例を図2、図3に示す。なお、錐形状の構造を持つ卵母細胞用容器1と電極3が一体で構成される場合はこの限りではない。

【0017】電気生理操作に使用される電極3の先端径は通常、1 μ mと非常に細いために接触により破損することが多い。特にガラス電極では電極3の最大径が1~2mmであることから電極挿入路4の内径も1~2mm程度と細い。このため顕微鏡やマニピュレーターなどを用いない手作業で電極3を破損することなく挿入することは困難であった。図2に示した電極保護容器5は錐形状の構造を持つ卵母細胞用容器1とは分離でき、かつ電極挿入路4の中心線は一致するようになっている。なお、電極3の最大径と電極挿入路4の内径の遊びは電極3の移動に支障がない程度に少ないことが望ましく、無駄な遊びは電極中心線のぶれを招き、電極3先端の破損につながる。

【0018】図3に図2に示した電極保護容器の操作方法の例を示す。図2に示した容器1と電極保護容器5の中心線が一致するように合わせ構造を設けているが、中心線を一致させる構造はこれに限定されるものではない。(A)電極保護容器5に電極3を後端（先端と反対側）から挿入する。(B)電極保護容器5の電極挿入路4内に電極3先端が完全に収まるように位置させる。

(C)電極3先端が電極挿入路4内に完全に収まった状態で容器1と電極保護容器5を合体させる。(D)電極

3を卵母細胞2に挿入する。この一連の操作により、電極3先端を破損することなく、容易に電極挿入操作を行うことができる。

【0019】図4に導電性電極を細胞内に挿入するための電極駆動構造の例を示す。

【0020】(A)は電極3と電極キャップ6を電極固定リング7で固定し、電極キャップ6と電極保護容器5にあるネジ部8の回転により生じた駆動力をそのまま電極3に伝え、電極3を回転させながら卵母細胞2に挿入する。回転力は手動を用いた場合と回転モータ9を用いる場合がある。

【0021】(B)は電極3をリニアに駆動することを目的とし、電極3と電極固定リング7を固定し、電極キャップ6の回転により生じた移動力をベアリング10により垂直方向の駆動力に変換する構造になっている。いずれも回転は手動で行う場合と回転モータ9などによって自動に行う場合がある。

【0022】(C)は電極3を電極固定リング7で固定し、電極3中心線と平行な駆動力を発生する垂直モータ11により、電極3を卵母細胞2に挿入する。

【0023】(D)は電極3とネジ部を持たない電極キャップ6を電極固定リング7で固定し、電極3の中心線と平行な駆動力を発生するリニアモータ12により、電極3を卵母細胞2に挿入する。

【0024】上記(A)、(B)、(C)、(D)いずれの例においても、電極の挿入操作を自動化する場合にその制御方法としては、電極3と接地点との電位の変化を検出する手段が考えられる。生きた卵母細胞2は膜電位を持っているため、電極3の先端が卵母細胞2の膜内に達すると電位が変化する。したがって、この時点で電極3が細胞内に挿入されたと判断し、挿入操作を終了すればよい。

【0025】実際には細胞膜に弾力があるために電極3先端が細胞膜と接触してから細胞膜がたわみ、その後電極3先端が細胞膜を突き破り、細胞内に達する。これにより、電極3が細胞に深く刺さった状態になるために卵母細胞2に対する損傷が大きくなる。そこで、電極3を卵母細胞2から抜けない程度に引き戻すことが望ましい。このために、電位をモニターしながら電位が変化しないところまで電極3を引き抜く操作が考えられる。

【0026】図1、図2および図4に示した例を構成要素としてセンサ状の卵母細胞用容器の具体例を図5に示す。錐形状の構造を持つ容器1、電極先端保護部13および電極3を細胞に挿入するための電極駆動部14から成り、それぞれの構成要素は図1、図2および図4に示した例の、どのような組み合わせも可能であり、本具体例に限定されるものではない。

【0027】本例では電極先端保護部と電極駆動部14の電極保護容器5と電極キャップ6が一体になっており、電極駆動部14は図4の(B)を採用している。ま

た、測定試料が血液や体液など様々の構成成分を含む場合、卵母細胞2下の試料用開口部15に透過膜16を膜固定キャップ17で設置することで選択的に試料を卵母細胞2に接触させることが可能となり、測定感度の向上が期待できる。電極移動時に圧力により卵母細胞が損傷することを避けるために流路兼排圧口18を設けた。

【0028】図6は図5に示したセンサ状卵母細胞用容器と、卵母細胞2の電気生理的变化量を測定する細胞用計測装置が独立した構成の一例である。本例は卓上型の装置構成の例であり、センサ状卵母細胞用容器と電極駆動器19を内蔵した卵母細胞計測器20と、電極駆動制御器21および電気生理測定器22から構成される計測制御器23から成る。

【0029】電極駆動器19の例は図4に示しており、電極駆動制御器21の制御方法は図4の説明文に記述してある。電気生理測定器22は卵母細胞2が発生する μ Aレベルの電流量が測定可能な1本電極膜電位固定法を利用した電流計が考えられる。本例は卵母細胞計測器20と計測制御器23を分離することで卵母細胞計測器20の小型、軽量化が図れるものである。

【0030】図7は流路により試料を卵母細胞に接触させる場合の装置構成の例である。定量ポンプ24を用いて安定的に溶液25を通液し、試料液26をバルブ27から添加して卵母細胞2に接触させる。流路の位置はA流路28のように卵母細胞2に対して横からの場合、B流路29のように卵母細胞2に対して上からの場合、C流路30のように卵母細胞2に対して下からの場合が考えられる。このような装置構成により、定量的な試料添加が可能になること、洗浄作用を持つ溶液25を通液することにより、試料液27を洗い流すことによって繰り返し測定が容易かつ精度良く行えるものである。

【0031】図8は容器1、電極保護容器5、電極駆動器19と電極駆動制御器21および電気生理測定器22を一体化した構成例である。本例は卵母細胞を用いて受容体やイオンチャンネルに対するリガンドを簡便に定量測定するために、測定系を一体化したものであり、携帯可能な卵母細胞計測装置である。

【0032】本装置は例えば、アレルギー疾患の原因物質であるヒスタミン、セレトニンやロイコトリエンなどケミカルメディエータの遺伝子を導入した卵母細胞を使用することにより、これらケミカルメディエータが鼻汁や血液などにどの程度含まれているかを簡便に計測することができる。これにより、医療現場や家庭などで容易にアレルギー反応の程度を判定することが可能となる。また、各種受容体遺伝子を導入した卵母細胞を用いることにより、においセンサなどいわゆる受容体を用いたバイオセンサに利用可能である。

【0033】

【発明の効果】本発明によれば、これまでは顕微鏡、マイクログラビメーターや除振台から成る大型の装置で

7

行われていた卵母細胞の電気生理実験を肉眼下で手作業により、容易に行うことが可能になる。更に装置の小型化が可能になることから、受容体を用いたバイオセンサとしても利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例の錐形状の構造を有する卵母細胞用容器の断面図。

【図2】本発明の一実施例の錐形状の構造を有する卵母細胞用容器の断面図。

【図3】電極先端の破損を防止する電極導入操作の一例を示す断面図。

【図4】導電性電極を細胞内に挿入するための電極駆動構造の一例を示す断面図。

【図5】センサ状の卵母細胞用容器の一例を示す断面図。

【図6】卵母細胞用容器と電気計測部を分離した卵母細胞用計測装置の一構成一例を示す説明図。

8

【図7】流路により試料を卵母細胞に接触させる装置構成の一例を示す説明図。

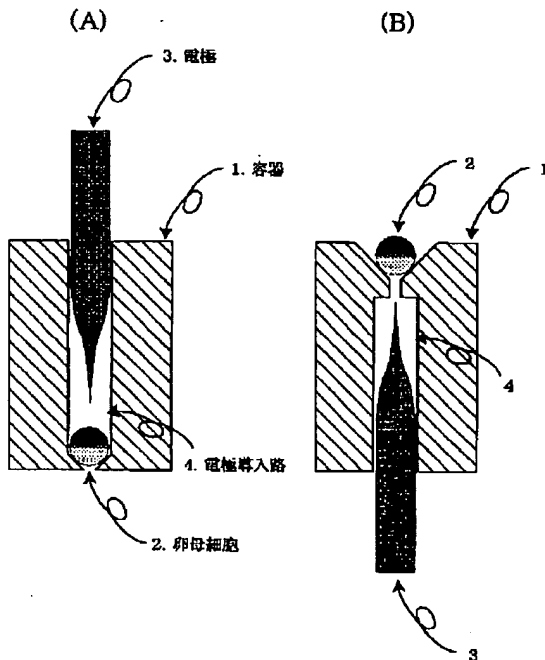
【図8】計測制御器を内蔵した卵母細胞センサの一構成例を示す断面図。

【符号の説明】

1…容器、2…卵母細胞、3…電極、4…電極導入路、5…電極保護容器、6…電極キャップ、7…電極固定リング、8…ネジ部、9…回転モータ、10…ベアリング、11…垂直モータ、12…リニアモータ、13…電極保護部、14…電極駆動部、15…試料用開口部、16…透過膜、17…膜固定キャップ、18…流路兼、排圧口、19…電極駆動器、20…卵母細胞計測器、21…電極駆動制御器、22…電気生理測定器、23…計測制御器、24…定量ポンプ、25…溶液、26…試料液、27…バルブ、28…A流路、29…B流路、30…C流路。

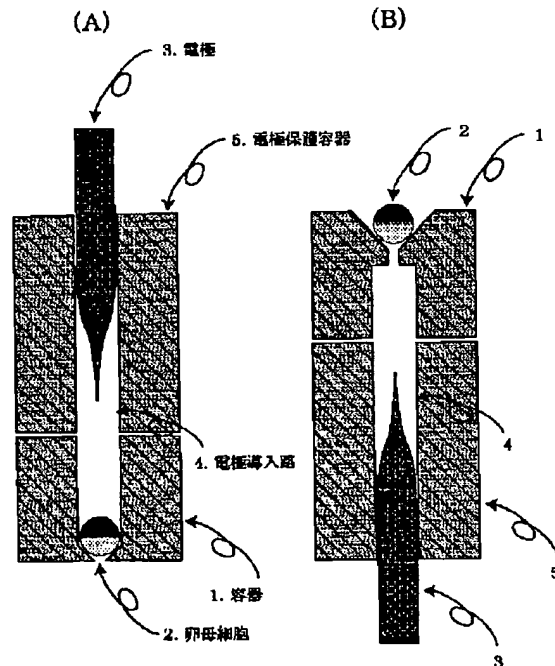
【図1】

図 1



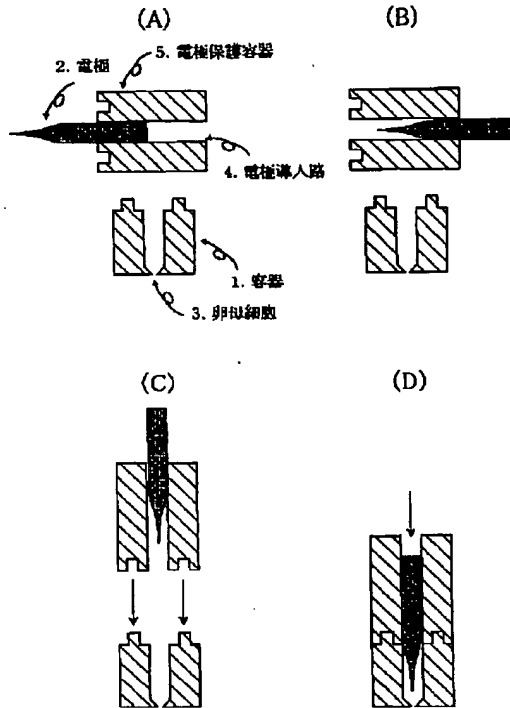
【図2】

図 2



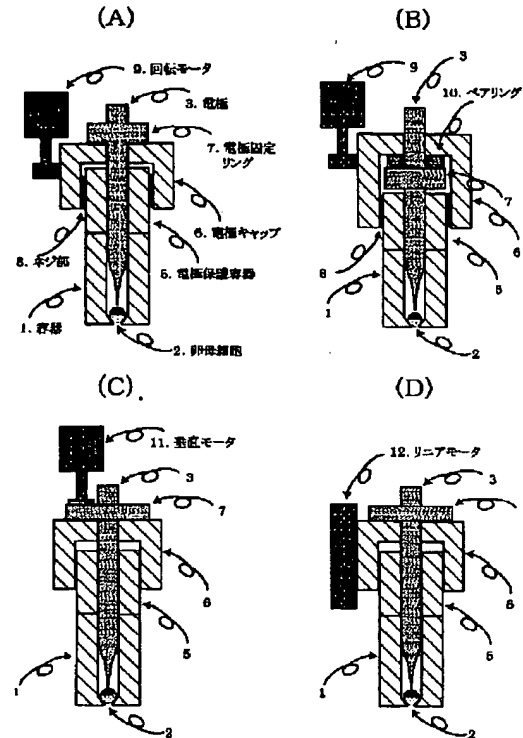
【図3】

図 3



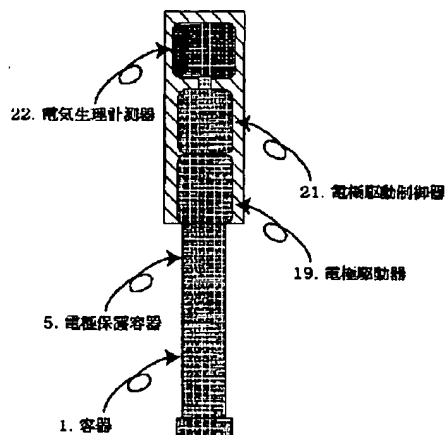
【図4】

図 4



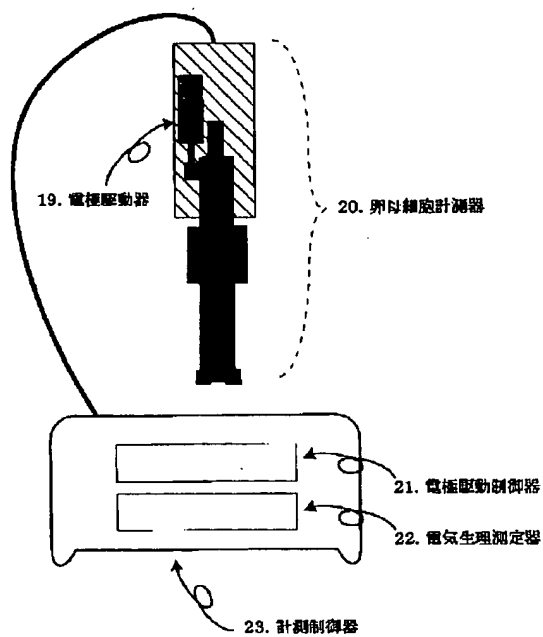
【図8】

図 8



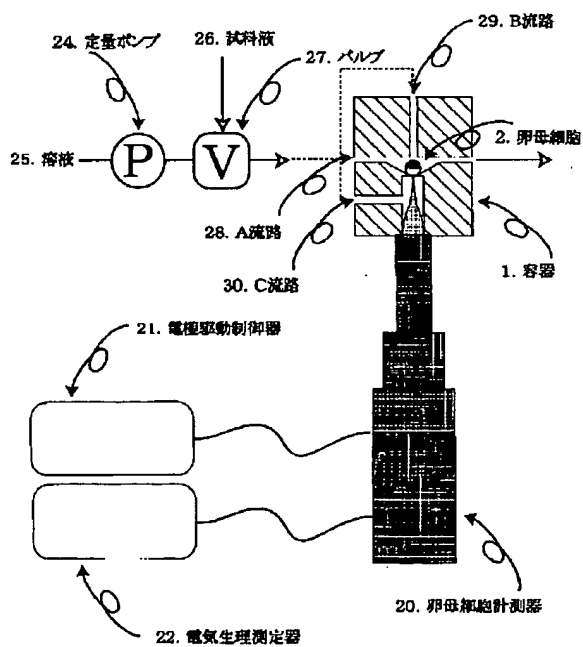
【図6】

图 6



【図7】

图 7



フロントページの続き

(72)発明者 坂本 健
埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内
(72)発明者 斉藤 栄
埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内

(72)発明者 松波 正吉
埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内
(72)発明者 守谷 騰
埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内